

|   |   |          |          |
|---|---|----------|----------|
| 氏 名   | SUKMA Ade   |          |          |
| 授与した学位  | 博 士   |          |          |
| 専攻分野の名称   | 学 術   |          |          |
| 学位授与番号  | 博甲第 5 6 3 2 号   |          |          |
| 学位授与の日付   | 平成 2 9 年 9 月 2 9 日  |          |          |
| 学位授与の要件   | 環境生命科学研究科 農生命科学専攻<br>(学位規則第 4 条第 1 項該当)   |          |          |
| 学位論文の題目   | Analysis of microbiota in, and isolation of nisin-producing <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> strains from, Indonesian traditional fermented milk, dadiah<br>(インドネシアの伝統的発酵乳ダディヒの細菌叢解析とダディヒからのナイシン生産性 <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> の分離) |          |          |
| 論文審査委員  | 教授 齋藤 昇   | 教授 森田 英利 | 教授 西野 直樹 |
| 学位論文内容の概要   |   |          |          |
| <p>Dadih is traditional buffalo fermented milk that is consumed in West Sumatra, Indonesia. To make dadih, raw buffalo milk is poured into a bamboo tube without heating (pasteurization), and then it is covered with banana leaves. After that, it is incubated for fermentation at room temperature for 2 days. Although starter cultures are rarely used, lactic acid bacteria such as <i>Lactococcus</i> and <i>Lactobacillus</i> are known to be predominants responsible for fermentation. However, true microbiota of dadih had been unknown. In this study, to reveal the dadih microbiota, we performed Illumina MiSeq deep sequencing of 16S ribosomal RNA genes extracted and amplified from 11 dadih samples. As a result, <i>Lactococcus</i>, <i>Lactobacillus</i> and <i>Leuconostoc</i> were predictably detected as predominant bacteria in dadih. On the other hand, potentially pathogenic <i>Klebsiella</i> and <i>Chryseobacterium</i> unexpectedly detected in most samples. It was also found that the microbiota community structure was various among the dadih samples even if collected from the same area. These results indicate that the dominative lactic acid bacteria (<i>Lactococcus</i>, <i>Lactobacillus</i> and <i>Leuconostoc</i>) responsible for fermentation exist almost stably, but the other bacterial members and population are diverse among dadih samples (tubes). In the first half of this study, the true microbiota of dadih is revealed using high-throughput sequencing for the first time in the world, and these findings will lead to further improvement for dadih preparation.</p> <p>In the latter half, isolation and characterization of nisin-producing strains of <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> from dadih samples, because a nisin-producer would be useful for fermentation control and preservation of dadih. Nisin is the most famous practical bacteriocin which is a peptide with strong antibacterial activity. First, 404 bacterial colonies were isolated using agar media from dadih samples. Among them, 6 strains with antibacterial activity were selected, and then identified as <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> using the API 50 CHL test and 16S rRNA gene sequencing. Next, all 6 strains were found to be genetically identical by a rep-PCR analysis. The antibacterial activity of a representative strain, D4, from the 6 strains was characterized to be comparatively stable between pH 2.0-11.0 and resistant to heating and storage; and it was inactivated with proteinase K. In addition, D4 had a broad-spectral antibacterial activity against Gram-positive bacteria including foodborne pathogens and food-spoilage bacteria. At last, D4 was revealed to be a nisin Z-producer by PCR analysis and the following sequencing to detect the nisin structural gene, <i>in situ</i> antibacterial activity assay to estimate size of the active molecule, and whole genome sequencing using the Illumina MiSeq platform to survey the nisin Z gene cluster. In the latter half of this study, the bacteriocin (nisin) producers were isolated from Indonesian foods for the first time. The isolated strains here will be useful as a fermentation control starter and a biopreservative of food products especially in Indonesia.</p> |   |          |          |

## 論文審査結果の要旨

本研究は、インドネシアのAndalas UniversityとのMaterial Transfer Agreement (MTA) により日本に運ばれた水牛乳を原料とする発酵乳ダディヒの細菌叢解析とダディヒからナisin生産性菌を分離した研究成果である。ダディヒの製造工程において興味深い点は、伐採直後の竹筒に、原料とする水牛乳を殺菌せず注ぎ込み、バナナの皮により蓋をして室温にて自然発酵させているにも関わらず、常に食中毒事故のない製品が製造されている点である。そこで、ダディヒはどのような細菌叢を有し、どのような菌種が良好な発酵に貢献しているのか興味深い。これまでは選択圧のある培養法のみで報告であった。本研究では、次世代シーケンサーによる網羅的な細菌叢解析により、その細菌叢は*Lactococcus*属を主要とした乳酸菌により構成されていることを明らかにした。一方で、良好な発酵には関係しないと考えられる*Klebsiella*属や*Chryseobacterium*属が混入している事実を突き止めたことで、今後、食品衛生上の観点から注意喚起をする情報を提供できる可能性がある。

次に、ダディヒを分離源として寒天培地で培養し404コロニーを釣菌し、抗菌活性によりスクリーニングした結果、6株の生菌を得た。それらはすべて*Lactococcus Lactis* subsp. *lactis*と同定され同菌株と推察したので、そのうちのD4株を代表株として以下の実験に供した。その結果、D4株は約3.5 kDのnisin Zを産生していることを明らかにした。また、D4株ゲノムには2,378のORF（遺伝子）が推定され、乳環境由来の*Lc. Lactis* subsp. *lactis* IL1403とは対照的に、D4株では糖およびアミノ酸の代謝・輸送に関わるORFを多くコードしていた。これは、乳環境以外の*Lc. Lactis* subsp. *lactis*の遺伝子構成の特徴と類似しており、自然発酵によるダディヒの*Lc. Lactis* subsp. *lactis*は乳環境（水牛乳）ではなく、竹筒もしくはバナナの皮に由来しているのではないかと推察される。

以上の研究成果は、環境生命科学の領域、特に畜産食品機能学かつ食品衛生学の分野に貢献すると考え、SUKMA Ade 氏に博士（学術）を授けるものとする。